

سنتز سریع و برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم توسط *Pseudomonas Cd11* و *pseudoalcaligenes* بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن



مراحم آشنگرف* و ارسلان خالدی

سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

نانوذرات سولفید کادمیوم به دلیل ویژگی‌های خاص فوتوالکتریکی کاربردهای فراوانی در ساخت سلول‌های خورشیدی حساس به رنگ، دیودهای انتشارگر نوری و ساخت نانویوسنسورها دارد. در این پژوهش، سنتز سبز و برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم توسط سویه های باکتری آبی مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات سنتز شده از طریق طیف‌های جذبی و نشری فلورسانس، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)، تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی (SEM) و همچنین طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR) مورد بررسی قرار گرفت. ۳۲ سویه باکتریایی آبی مقاوم به کادمیوم براساس تکنیک غنی سازی جداسازی شد که در این میان *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain Cd11 قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم بود. سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم تولید شده توسط سویه باکتری مذکور تحت شرایط بهینه واکنش مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، سوپرناتانت کشت سویه مذکور بعد از مواجهه با محلول سولفات کادمیوم (غلظت ۳ میلی‌مولار از یون کادمیوم)، قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم کروی در محدوده پراکنش ذرات بین ۱۲ تا ۱۹ نانومتر با میانگین اندازه ۱۵/۵ نانومتر در pH برابر ۸ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۱۰ ساعت گرماگذاری بود. نتایج اثرات ضد میکروبی به روش انتشار از چاهک بر سطح آگار نشان داد که نانوذرات زیستی تولید شده علیه همه میکروبهای تست شده اثر مهارکنندگی رشد را دارد. نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده در مطالعه اخیر دارای دامنه پراکنش اندازه ذرات مناسب و همگن بوده که همین امر کارایی نانوذرات زیستی سنتز شده را مناسب می‌کند.

واژه های کلیدی: نانوسولفید کادمیوم، سنتز برون سلولی، الگوی مقاومت، خاصیت ضد میکروبی، *P. pseudoalcaligenes* Cd11

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۷-۳۳۶۶۴۶۰۰، پست الکترونیکی: m.ashengroph@uok.ac.ir

مقدمه

گرفتن اثرات سطح و اثرات اندازه کوانتومی نانو ذرات سولفید کادمیوم می‌توانند خواص جدید نوری، الکترونیکی، مغناطیسی، شیمیایی و ساختاری را نمایش دهند که ممکن است در بسیاری از زمینه‌های فناوری کاربرد داشته باشند. بنابراین نانوذرات سولفید کادمیوم در مجموعه یک سیستم جذاب برای بررسی سنتیک شیمیایی نانوکریستالها و نحوه ساخت مراحل نانو مواد و همچنین کاربردهای مختلف آن است (۳۱). از کاربردهای نانوذرات

نانوذرات سولفید کادمیوم دارای خواص فیزیکی، شیمیایی و ساختاری منحصر به فرد نسبت به حالت بالک هستند. نقطه ذوب، طیف جذب نوری، ساختار بلوری و دیگر خواص نانو ذرات سولفید کادمیوم، همگی تحت تأثیر اندازه نانوذرات است. با توجه به پایداری بالا، خواص شیمیایی، فیزیکی و ساختاری منحصر به فرد، در دسترس بودن و سهولت آماده سازی، نانو ذرات سولفید کادمیوم را می‌توان در زمینه‌های مختلف زندگی به کار برد. با در نظر

نه تنها در برابر آن مقاوم هستند بلکه قادر به احیای آن به صورت نانو ذرات سولفید کادمیوم و اکسید کادمیوم می‌باشند (۲۲). دامرون (Dameron) و همکاران اولین کسانی بودند که در سال ۱۹۸۹ با استفاده از سویه های مخمری *Schizosaccharomyces pombe* و *Candida glabrata* کشت داده شده در حضور نمکهای کادمیوم موفق به سنتز درون سلولی نانوذرات نیمه هادی سولفید کادمیوم شدند، آنها گزارش دادند که تشکیل نانوذرات سولفید کادمیوم بستگی به مرحله‌ای از رشد باکتری دارد که طی آن یونهای کادمیوم اضافه می‌شود و هنگامی که یون کادمیوم در مرحله رشد لگاریتمی اضافه گردد حداکثر تولید نانوذره به دست خواهد آمد (۹). سنتز درون سلولی و برون سلولی زیستی نانوذرات سولفید کادمیوم در طیف وسیعی از سویه‌های مختلف میکروبی متعلق به جنسهای باکتریایی و قارچی شامل *Clostridium* (۸)، *Klebsiella* (۱۱)، *Schizosaccharomyces* (۱۵)، *Fusarium* (۲)، *Escherichia coli* (۳۲)، *Rhodopseudomonas* (۴)، *Coriolus* (۲۸)، *Sachharomyces* (۲۳)، *Phormidium* (۱۹)، *Serratia* (۲۳)، *Pseudomonas* (۲۶) گزارش شده است. در این پژوهش، قابلیت ذاتی سویه‌های بومی باکتریایی آبی به‌عنوان زیست کاتالیزگر در احیای زیستی سولفات کادمیوم به نانوذرات سولفید کادمیوم و همچنین بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات سبز سنتز شده مورد بررسی قرار گرفته و برای نخستین بار سنتز سریع و خارج سلولی نانوکوانتوم دات سولفید کادمیوم در سویه بومی متعلق به Cd11 *P. pseudoalcaligenes* گزارش شده است.

مواد و روشها

نمونه برداری، غنی سازی و جداسازی سویه های باکتری: برای غنی سازی باکتریهای آبی بومی مقاوم به یون کادمیوم، نمونه گیری از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتیمتری از آبهای مناطق مختلف ایران شامل سواحل بوشهر، سواحل

سولفید کادمیوم می‌توان به ساخت نانو بیوسنسورهای الکتروشیمیایی (۱۷)، سیستمهای تحویل دارو (قابلیت حمل دزهای مؤثری از دارو به سلولهای بافت هدف) (۲۹) و همچنین تجزیه آب و تولید هیدروژن (۳۵) به منظور ایجاد توسعه منابع انرژی پاک و جایگزین جدید مانند تولید فوتوکاتالیتیکی هیدروژن از منابع طبیعی نظیر آب و انرژی خورشید انجام شده است، اشاره نمود. انواع مختلف روشهای فیزیکی و شیمیایی از جمله استفاده از لیگاندهای سمی جهت ایجاد حلالیت در حلالهای آلی (۱۸)، روش سنتز از فاز بخار (۲۴)، روش پرتو لیزر-پالسی (۳۱) و روش سنتز احتراقی (۳) برای سنتز کوانتوم دات سولفید کادمیوم وجود دارد. استفاده از روشهای سنتزی فیزیکی به دلیل هزینه بالای تجهیزات و راندمان پایین و همچنین روشهای سنتز شیمیایی به دلیل نیاز به مواد شیمیایی قوی و عوامل حفاظتی (سدیم بوروهیدرات، سدیم سترات و الکل) که اکثراً سمی و قابل اشتعال بوده و به علت مسائل زیست محیطی با محدودیت و چالشهای جدی روبرو شده است (۳ و ۲۷). این در حالی است که فرآیند سنتز زیستی با استفاده از سلولهای میکروبی نسبت به روشهای فیزیکی و شیمیایی یک تکنیک کم هزینه، غیر سمی و با وجود راندمان نسبتاً پایین صنعتی، یک رویکرد سازگار با محیط زیست می‌باشد (۱۰). بنابراین باتوجه به نکات فوق، هر چند با روشهای شیمیایی و فیزیکی می‌توان مقدار زیادی نانوذره با اشکال متفاوت در زمان نسبتاً کوتاهی تولید کنند اما این روشها قدیمی، پیچیده و پرهزینه هستند و باعث تولید ضایعات سمی می‌شوند که نه تنها به محیط زیست بلکه به سلامت انسان نیز آسیب می‌رسانند. در روش زیستی با استفاده از سلولهای میکروبی به‌عنوان کاتالیزگر استفاده از مواد شیمیایی گران قیمت حذف می‌شود. همچنین انرژی مصرفی در این روش بسیار کمتر از روشهای شیمیایی است و باتوجه به سازگار بودن با محیط زیست یک تکنیک برتر است (۱۶). علیرغم سمیت کادمیوم برای بسیاری از میکروارگانیسمها تعدادی از آنها

از سوسپانسیون تهیه شده باکتریها (با تراکم ۰/۵ مک فارلند: 1.5×10^8 CFU/ml) به چاهکهای الیزای حاوی ۱۴۰ میکرولیتر تریپتیک سوی براث شامل غلظتهای مشخصی از یون کادمیوم، اضافه گردید. پلیتهای مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. پس از طی مدت زمان گرماگذاری، میزان کدورت باکتریایی توسط دستگاه الیزا ریدر در مقایسه با شاهد‌های تهیه شده در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی توانایی سنتز خارج سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم توسط سویه‌های باکتری مقاوم به کادمیوم: یک لوپ از باکتریهای رشد یافته تازه (۲۴ ساعته) بر روی محیط تریپتیک سوی آگار را به محیط تریپتیک سوی براث (۵۰ میلی لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری) تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. از این محیط به منظور تلقیح در محیطهای کشت استفاده گردید. ۵ درصد از سوسپانسیون های باکتری تهیه شده را در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بر روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده زیستی باکتری از محیط کشت تریپتیک سوی براث، از سانتریفیوژ یخچالی با دور $5000 \times g$ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با آب دمین استریل، ۱۰ گرم از توده زیستی مذکور در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دمین استریل بود، ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، میسلیوم‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و از سوپرناتانت‌های عاری از میسلیوم باکتری جمع‌آوری شده به‌عنوان زیست‌کاتالیزگر

جزایر قشم، کیش و لاوان و همچنین از آب چشمه‌های مختلف استان کردستان و کرمانشاه انجام شد. نمونه‌های آب در ظروف دردار استریل جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند. ۲۰ میلی لیتر از نمونه‌های آب جمع‌آوری شده به لوله‌های فالكون ۴۵ میلی لیتری استریل منتقل شد و در دور $4500 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را دور ریخته و مقدار یک میلی لیتر از مایع تحتانی به محیطهای کشت غنی شده و انتخابی تریپتیک سوی آگار منتقل شد. به محیطهای کشت مذکور، یون کادمیوم در غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار، پس از استریل شدن توسط فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۵ میکرونی، افزوده شد. پلیتها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. کلنیهای باکتریایی با استفاده از ویژگیهای ظاهری مشخص شدند. به منظور خالص‌سازی سویه‌های باکتری غنی شده، هر کلنی باکتری به محیطهای کشت تریپتیک سوی آگار حاوی ۰/۵ میلی مولار کادمیوم منتقل و به روش خطی کشت داده شد. تجدید کشت تا حصول اطمینان از خالص بودن جدایه‌های باکتری انجام شد.

تعیین الگوی مقاومت سویه‌های باکتری جدا شده نسبت به یون سمی کادمیوم: از روش میکروپلیت با استفاده از چاهکهای الیزای ۹۶ تایی برای سنجش میزان تحمل پذیری به یون سمی کادمیوم استفاده شد (۶). برای این منظور ابتدا محلولهای استوک کادمیوم در آب مقطر استریل تهیه شد. پس از آن با استفاده از پالایه‌های غشایی میلی پور ۰/۲ میکرونی استریل شد. میزان تراکم استفاده شده برای یون کادمیوم بر حسب میلی مولار عبارت بود از ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳. پس از تهیه محلولهای استوک کادمیوم و تهیه رقت‌هایی از تراکمهای ذکر شده در محیط تریپتیک سوی براث، به میزان ۱۰ میکرولیتر

(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) تکثیر شد (۳۴). شرایط اعمال شده در این واکنش مشتمل بود بر: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه سپس ۳۰ سیکل به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر به DNA ژنومی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. نتایج مربوط به تعیین توالیهای رفت و برگشت پس از ویرایش توسط نرم افزارهای BioEdit و FinchTV به صورت یک توالی کامل تهیه شد. سپس توالیهای به دست آمده توسط نرم افزار BLAST موجود در بانک ژنی NCBI با باکتریهای موجود مقایسه شد. در ادامه به منظور تأیید نتایج حاصل از بلاست، درخت فیلوژنتیکی برای سویه Cd11 با استفاده از نرم افزار MEGA. 6 و بر پایه روش neighbor-joining و با بوت استرپ ۱۰۰ تکرار ترسیم شد. همچنین فاصله ژنتیکی بر پایه روش Kimura-2-parametr محاسبه شد (۳۳).

سنتر برون سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم توسط سویه منتخب Cd11، بهینه سازی فرآیند و بررسی اثرات ضد باکتریایی: یک لوپ کامل از سویه باکتری Cd11، برداشت شده از یک کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط تریپتیک سوی براث، به یک محلول نمکی استریل حاوی ۰/۸۵ درصد نمک سدیم کلراید منتقل شده و به مدت نیم ساعت بر روی یک شیکر دورانی با سرعت ۲۰۰ rpm همزده شد. حدود ۵ میلی لیتر از غلظت باکتری مورد نظر (10^8 CFU/ml) به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث درون فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری و تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر دورانی با سرعت ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت گرمگذاری شد. برای جدا کردن توده زیستی باکتری از محیط کشت

برای احیای زیستی سولفات کادمیوم به کوانتوم دات سولفید کادمیوم استفاده شد. برای این منظور به فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از سوپرناتانت برداشت شده باکتری، محلول سولفات کادمیوم (با غلظت نهایی ۱ میلی مولار یون کادمیوم) اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر rpm ۱۵۰ گرمگذاری شد. به طور همزمان از محلول سولفات کادمیوم (بدون تلقیح سوپرناتانت کشت باکتری) و سوپرناتانت کشت (بدون حضور یون کادمیوم) به عنوان محیطهای کنترل منفی استفاده شد (۱). طیف جذبی نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی، مورد آنالیز UV-visible spectrophotometer (مدل Specord 210 ساخت کشور آلمان) قرار گرفت

شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه باکتری Cd11:

شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه مذکور براساس شکل ظاهری، واکنش گرم، تستهای اکسیداز و کاتالاز، احیای نیترات، تست مصرف سیترات، هیدرولیز اوره، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز توین، هیدرولیز تیروزین، رشد در دماهای مختلف، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی از جمله گلوکز، فروکتوز، آرابینوز، مانیتول، سوکروز، مالتوز، زایلوز و همچنین تولید اسید از منابع الکلی از جمله گلیسرول و اتانول طبق کتاب مرجع برگگی (۱۲) انجام شد. استخراج DNA ژنومی سویه مذکور با استفاده از روش جوشاندن صورت گرفت. در این روش سوسپانسیونی از کلنی خالص باکتری در یک میلی لیتر آب دوبار تقطیر استریل تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده می شود و پس از آن در دور ۳۰۰۰ ×g ۲ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به دنبال سانتریفیوژ کردن، ۲ میکرولیتر از مایع رویی حاوی DNA به عنوان DNA الگو برای واکنش PCR استفاده شد (۲۱). سپس ژن 16S rDNA با جفت آغازگرهای عمومی fd1

پراکنش اندازه نانوذرات سولفید روی و همچنین تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل Mira 3- LMU ساخت کشور چک) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین طیف جذبی اسپکتروفوتومتری و طیف نشر فلورسانس محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با سرعت $5000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد. سپس آنالیزهای FTIR، EDX و SEM با هدف بررسی وضعیت نانو کریستالهای تشکیل شده و همچنین بررسی شکل و اندازه آنها انجام پذیرفت. برای این منظور ابتدا سوپرناتانت عاری از توده زیستی باکتری از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و سپس با هدف رسوب نانوذرات سولفید کادمیوم، اتانول مطلق به نسبت ۳ به ۱ به نمونه‌ها افزوده شد و پس از چند بار سانتریفیوژ ($5000 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه)، رسوب حاصل با آب زمین استریل شستشو داده شد. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه فریزدرایر (مدل Alpha 1-2Dplus ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. فعالیت ضد میکروبی کوانتوم دات سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشت سویه باکتری Cd11 در برابر گونه‌های مختلف باکتریایی با پتانسیل تشکیل بیوفیلم بر سطوح زنده و غیر زنده از طریق اندازه‌گیری هاله عدم رشد و به روش انتشار چاهک بر سطح آگار سنجش شد. در این روش پس از آماده سازی سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند (1×10^8 CFU/ml)، با استفاده از سوآپ استریل بر سطح محیط کشت نوترینت آگار، کشت چمنی از باکتریهای مورد مطالعه انجام شد. بعد به کمک چوب پنبه سوراخ کن چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی متر ایجاد شد و کف چاهکها با استفاده از ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاوی نانوذرات سنتز شده پوشانده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب گرماگذاری شدند. در نهایت با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، میزان حساسیت باکتریها مورد سنجش قرار گرفت. باکتریهای مورد مطالعه شامل *Bacillus*، *E. coli* IBRC-M11018

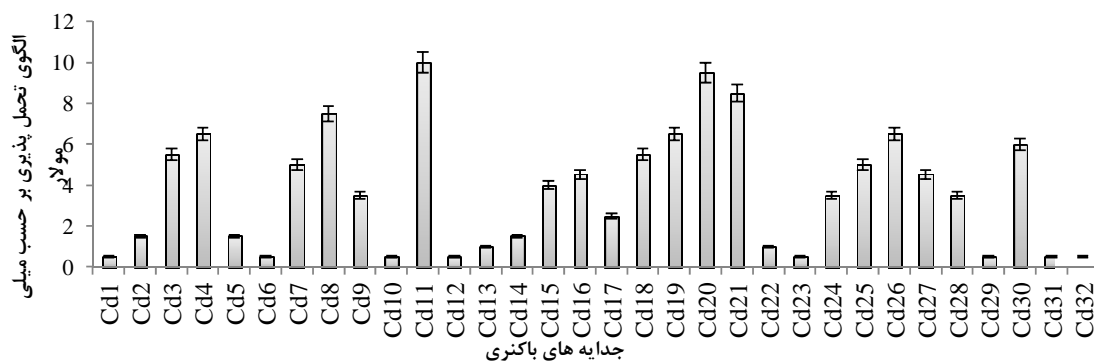
مایع تریپتیک سوی برای، از سانتریفیوژ یخچالی با دور $5000 \times$ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژیک استریل، ۲۵ گرم از توده زیستی مذکور در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب زمین استریل بود، ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰rpm قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، توده باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شد. پس از جمع آوری، از سوپرناتانت عاری از توده زیستی باکتری، به عنوان زیست کاتالیزگر، برای سنتز کوانتوم دات سولفید کادمیوم استفاده شد. برای این منظور به فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از سوپرناتانت برداشت شده باکتری، محلول سولفات کادمیوم (با غلظت نهایی ۱ میلی مولار یون کادمیوم) اضافه شده و به مدت ۸ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۵۰rpm گرماگذاری شد. به طور همزمان از محلول سولفات کادمیوم (بدون تلقیح سوپرناتانت باکتری Cd11) بعنوان محیط کنترل استفاده گردید. در ادامه و با هدف بهینه سازی فرآیند، بررسی اثر غلظتهای اولیه یون کادمیوم (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی مولار)، اثرات دما (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد)، اثرات pH (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) و اثر دوره انکوباسیون (۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ و ۷۲ ساعت) بر روی سنتز نانوسولفید کادمیوم در محیط زیست تبدیلی تحت شرایط واکنش مذکور بررسی شد. همه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده در محیط زیستی حاصل از واکنش سوپرناتانت عاری از کشت باکتری Cd11 به عنوان زیست کاتالیزگر در معرض سولفات کادمیوم، با استفاده از تستهای دستگاه اسپکتروفوتومتری UV-Vis، دستگاه فلورسانس (مدل Cary-Eclipse ساخت کشور آمریکا)، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس، دستگاه FTIR (مدل Bruker, VECTOR 22 ساخت کشور آلمان)، هیستوگرام و منحنی نرمال مربوط به دامنه

مختلف ایران جداسازی شد. تحمل پذیری ذاتی این سویه‌ها نسبت به یون سمی کادمیوم به وسیله روش میکروپلیت الیزا تعیین گردید. براساس نتایج به دست آمده، ۳۲ سویه باکتری جداسازی شده تحمل پذیری بین ۰/۵ تا ۱۰ میلی مولار را نسبت به یون سمی کادمیوم از خود نشان دادند (شکل ۱). در این میان ۱۱ سویه باکتری (نامگذاری شده تحت عنوان Cd3, Cd4, Cd7, Cd8, Cd11, Cd18, Cd19, Cd20, Cd21, Cd26, Cd30) که تحمل پذیری بالاتر از ۵ میلی مولار را از خود نشان دادند انتخاب و جهت بررسی قابلیت احیای یون سولفات کادمیوم به نانو سولفید کادمیوم (به صورت خارج سلولی) در محیط تریپتیک سوی براث مورد بررسی قرار گرفتند.

Staphylococcus aureus subtilis IBRC-M10742
Pseudomonas aeruginosa IBRC-، IBRC-M10690
 M10828، *Lactobacillus plantarum* IBRC-M10817 و
Pseudomonas fluorescens IBRC-M10752 بودند. این میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به صورت آمپول لیوفلیزه از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران، خریداری شد.

نتایج

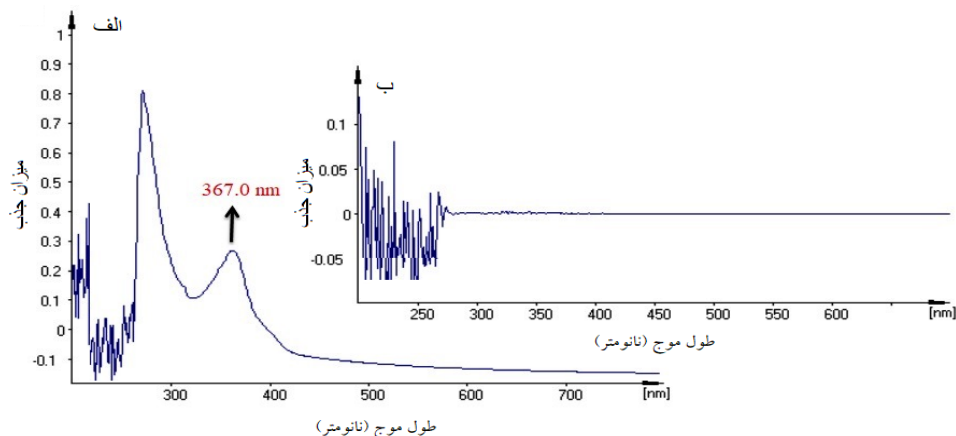
جداسازی سویه‌های باکتری آبی‌داری تحمل پذیری بالا به یون سمی کادمیوم: در مجموع ۳۲ سویه باکتریایی (که حداقل مورفولوژی متفاوتی داشتند) در محیط غنی کننده تریپتیک سوی براث/آگار حاوی ۰/۵ میلی مولار یون کادمیوم، از ۲۵ نمونه آب جمع آوری شده از مناطق



شکل ۱- الگوی تحمل پذیری سویه‌های باکتری آبی به یون سمی کادمیوم در محیط کشت تریپتیک سوی براث

از میان ۱۱ سویه باکتری با قابلیت تحمل پذیری بالا نسبت به یون سمی کادمیوم، تنها سوپرناتانت کشت سویه Cd11، جدا شده از آب جمع آوری شده از سواحل قشم، قادر به احیای خارج سلولی یونهای کادمیوم به نانو سولفید کادمیوم در غلظت ۱ میلی مولار از یون سمی کادمیوم بود که با استفاده از آنالیزهای طیف سنجی جذبی و نشری UV-vis اسپکتروفتومتری و فلورسانس مشخص شد. آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری UV-vis، یک پیک جذبی مشخص را در طول موج نانومتر ۳۶۷ (پیک

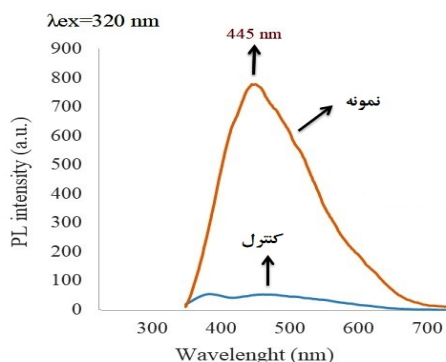
اختصاصی برای نانوذرات سولفید کادمیوم) را نشان داد که بیانگر وجود کوانتوم دات سولفید کادمیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۲ قسمت الف). براساس منابع معتبر بیشینه پیک جذبی نانوذرات سولفید کادمیوم در طول موجهای ۳۶۰ تا ۴۲۵ نانومتر می باشد (۴). در محلول کنترل (عاری از سوپرناتانت کشت باکتری)، در طول موجهای بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر هیچ پیک جذبی مشاهده نشد (شکل ۲ قسمت ب).



شکل ۲- طیف‌های اسپکتروفتومتری محلول‌های سولفات کادمیوم (غلظت یون کادمیوم ۱ میلی مولار، pH برابر ۷)، عاری از سوپرناتانت (قسمت ب) و به دنبال اضافه کردن سوپرناتانت کشت سویه Cd11 (قسمت الف)، پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی در ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه).

سولفید کادمیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی است (شکل ۳). براساس منابع معتبر بیشینه پیک نشری نانوذرات سولفید کادمیوم در طول موجهای ۴۴۰ تا ۴۷۰ نانومتر می باشد (۳۰). در محلول کنترل (عاری از سوپرناتانت کشت باکتری)، در طول موجهای بین ۲۵۰ تا ۵۵۰ نانومتر هیچ پیک نشری مشاهده نشد.

در ادامه و با هدف اطمینان از تشکیل نانو سولفید کادمیوم در واکنش زیست تبدیلی توسط سوپرناتانت کشت سویه باکتری Cd11، آنالیز نمونه‌ها به کمک طیف سنجی فلورسانس انجام شد. آنالیز نمونه‌ها با طیف سنجی فلورسانس، یک پیک نشری مشخص را در طول موج نانومتر ۴۴۵ نشان داد که بیانگر وجود نانو



شکل ۳- طیف‌های نشری فلورسانس محلول‌های سولفات کادمیوم (غلظت یون کادمیوم ۱ میلی مولار، pH برابر ۷)، عاری از سوپرناتانت (کنترل) و به دنبال اضافه کردن سوپرناتانت کشت سویه Cd11 (نمونه)، پس از ۸ ساعت واکنش زیست تبدیلی در ۲۵ درجه سانتی گراد روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه).

کواتوم دات سولفید کادمیوم را دارا بود، انتخاب و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تشخیصی متداول باکتریها مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۱).

شناسایی فنوتیپی و مولکولی سویه منتخب Cd11: سویه باکتری Cd11 که براساس آنالیزهای ظاهری و مشاهدات دستگامی با استفاده از آنالیزهای اسپکتروفتومتری و فلورسانس قابلیت احیای زیستی سولفات کادمیوم به

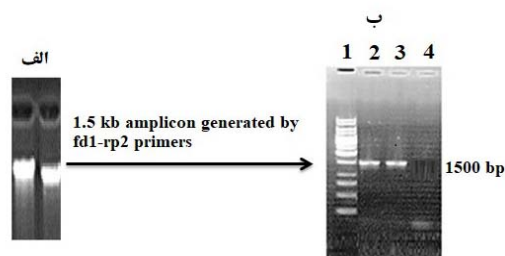
جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه منتخب Cd11

ویژگی	سویه Cd11	ویژگی	سویه Cd11
شکل ظاهری	میله ای شکل	تولید اسید از گلوکز	منفی
واکنش گرم	منفی	تولید اسید از فروکتوز	منفی
تست اکسیداز	مثبت	تولید اسید از آرابینوز	منفی
تست کاتالاز	مثبت	تولید اسید از مانیتول	منفی
احیای نیترات	مثبت	تولید اسید از سوکروز	منفی
مصرف سیترات	مثبت	تولید اسید از اتانول	مثبت
هیدرولیز اوره	منفی	تولید اسید از گلیسرول	مثبت
هیدرولیز ژلاتین	منفی	تولید اسید از مالتوز	منفی
هیدرولیز کازئین	منفی	تولید اسید از زایلوز	منفی
هیدرولیز توپین ۸۰	منفی	رشد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد	مثبت
هیدرولیز تیروزین	مثبت	رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد	مثبت

مورد نظر شناسایی شد. براساس نتایج حاصل از بلاست این سویه دارای مشابهت بیش از ۹۸ درصدی با سویه‌های متعلق به گونه باکتری *P. pseudoalcaligenes* می‌باشد. بعد از تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA، این ژن در بانک اطلاعات ژنی با شماره دسترسی MG857585 ثبت شد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیکی نیز تأیید کرد که سویه مورد نظر به جنس *Pseudomonas* تعلق دارد و علاوه بر این احتمالاً می‌تواند به عنوان سویه جدید متعلق به گونه باکتری *P. pseudoalcaligenes* طبقه بندی شود. در درخت فیلوژنی (شکل ۵) که بر اساس آنالیزهای توالی ژن ۱۶S rDNA به روش neighbor-joining به دست آمده است، موقعیت سویه Cd11 در میان گونه‌های متعلق به جنس *Pseudomonas* نشان داده شده است.

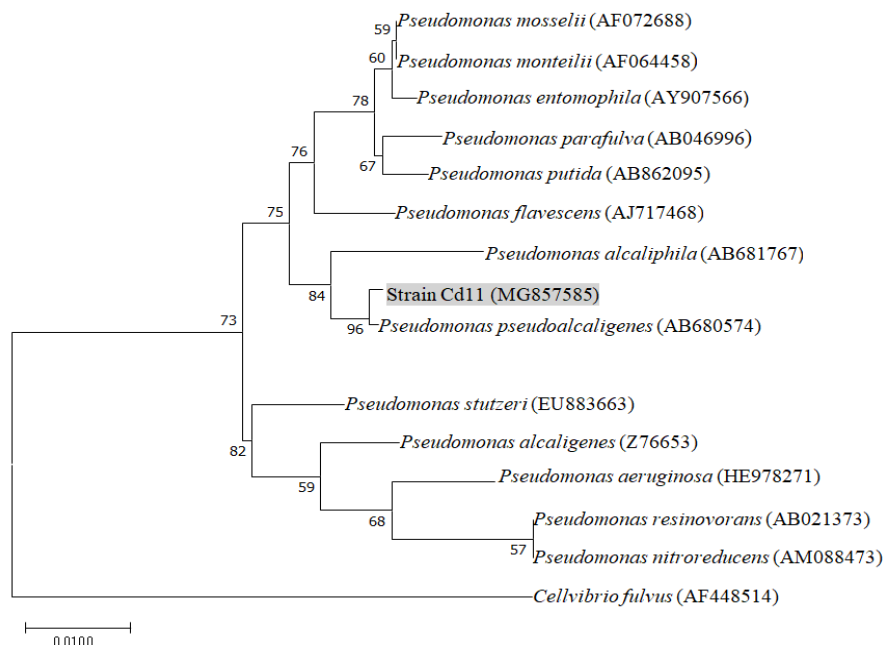
اثر فاکتورهای مختلف بر روی تولید نانوسولفید کادمیوم در واکنش کاتالیست شده توسط سوپرناتانت کشت باکتری Cd11 *P. pseudoalcaligenes* همان گونه که در شکل (۶ قسمت‌های الف تا د) نشان داده شده است، بیشترین تولید نانوسولفید کادمیوم در غلظت بهینه ۳ میلی مولار از یون کادمیوم، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۸ و پس از ۱۰ ساعت گرماگذاری مشاهده شده است.

براساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی و بر طبق کتابهای مرجع، سویه Cd11 به طور موقت به عنوان *Pseudomonas pseudoalcaligenes* تشخیص داده شد. جهت شناسایی دقیق سویه Cd11، ابتدا DNA ژنومی استخراج (شکل ۴ قسمت الف) و سپس ژن کد کننده نواحی 16S rDNA از طریق پرایمرهای یونیورسال fd1 و rp2 مورد واکنش PCR قرار گرفت (شکل ۴ قسمت ب). همان گونه که در شکل قابل مشاهده می‌باشد محصول PCR مناسب در ناحیه ۱۵۰۰ pb نمایان شده که بیانگر خلوص DNA مورد استفاده جهت تعیین توالی می‌باشد.

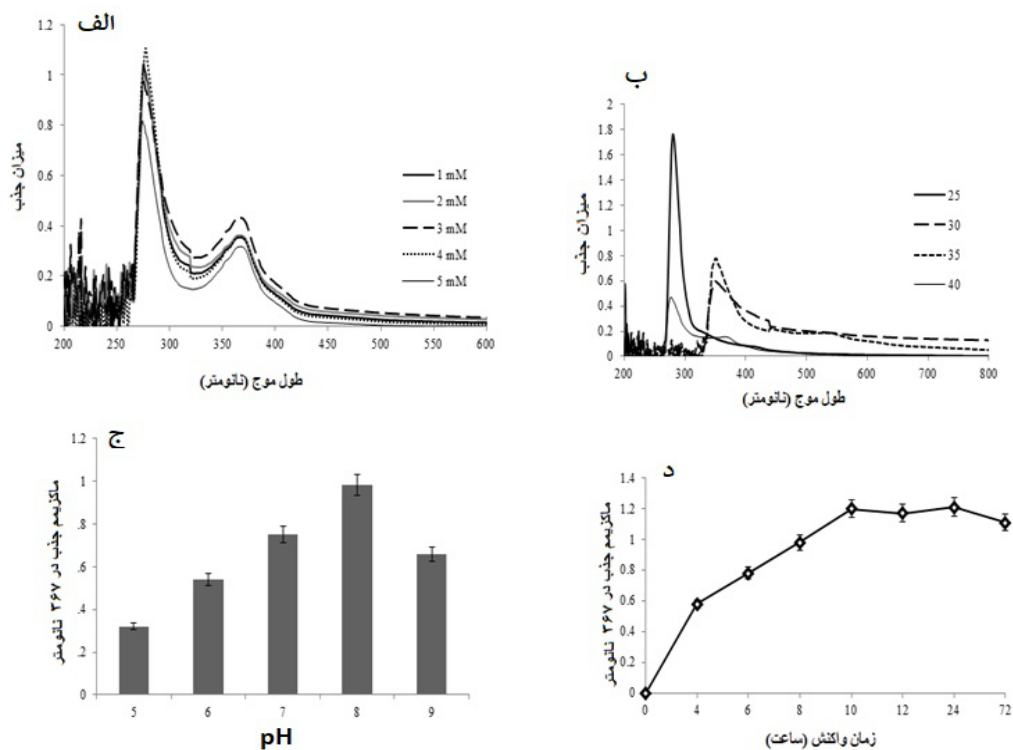


شکل ۴- (الف) تصویر DNA ژنومی استخراج شده (ب) ژل الکتروفورز محصول PCR سویه منتخب Cd11: ستون ۱ مارکر یک کیلوبازی فرمتاز، ستونهای ۲ و ۳: سویه باکتری Cd11 و ستون ۴: کنترل منفی (فاقد DNA الگو)

پس از مشخص شدن توالی ژن 16S rDNA سویه مذکور و بلاست نمودن آن در سایت اینترنتی NCBI، باکتری



شکل ۵- درخت فیلوژنی سویه Cd11 و دیگر اعضای جنس *Pseudomonas* بر اساس ژن تکثیر یافته rDNA ۱۶S. شماره دسترسی سویه های ثبت شده در پراپتز آورده شده است.

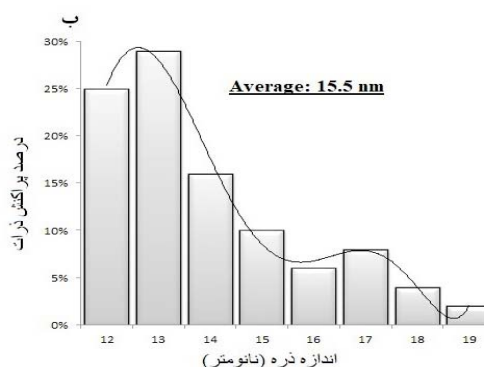
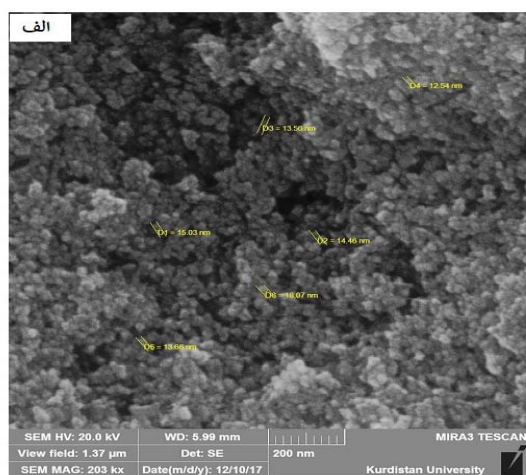


شکل ۶- اثر پارامترهای مختلف بر روی سنتز خارج سلولی نانو سولفید کادمیوم در مخلوط واکنش زیست تبدیلی حاوی سوپرناتانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11. الف- تأثیر غلظت‌های مختلف یون کادمیوم بعد از ۸ ساعت گرماگذاری، تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm. ب- اثر دماهای مختلف بر روی سنتز نانوذرات بعد از ۸ ساعت گرماگذاری در غلظت بهینه ۳ میلی‌مولار یون

کادمیوم، دور شیکر ۱۵۰ rpm و تحت شرایط pH برابر ۷ ج- تأثیر pH مختلف بر روی سنتز نانوذرات سولفید کادمیوم در غلظت بهینه ۳ میلی مولار یون کادمیوم تحت شرایط دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm و د- اثر دوره گرماگذاری بر روی سنتز خارج سلولی نانو سولفید کادمیوم تحت شرایط بهینه شده توسط روش تک عاملی

هدف بررسی شکل و پراکنش اندازه نانو سولفید کادمیوم سنتز شده به صورت برون سلولی توسط سوپرنانانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 تعیین گردید. در شکل (۷) تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی SEM و دامنه پراکنش اندازه نانوذرات مذکور نشان داده شده است. همان گونه که در شکل (۷) نشان داده شده است، تصاویر حاصل، سنتز نانو سولفید کادمیوم با پراکنش باریک اندازه ذرات (۱۹-۱۲ نانومتر) و متوسط اندازه ذرات ۱۵/۵ نانومتر را نشان داد.

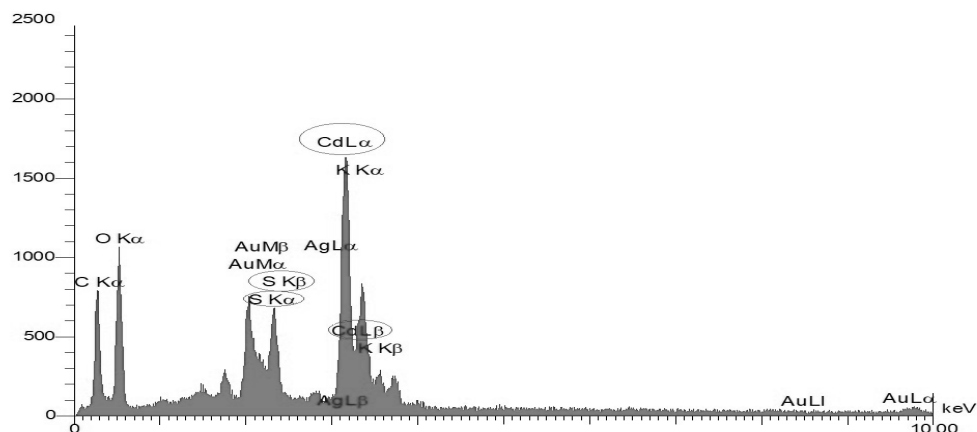
بررسیهای میکروسکوپی و طیف سنجی نانوذرات تولید شده توسط *P. pseudoalcaligenes* Cd11 به دنبال تشخیص اولیه سنتز نانو سولفید کادمیوم توسط باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 جهت بررسی ساختار، مورفولوژی و پایداری نانوذرات تشکیل شده در محلول واکنش زیست تبدیلی از آزمونهای متفاوت از جمله هیستوگرام توزیع اندازه ذرات و تصویربرداری SEM، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و طیف سنجی مادون قرمز فوریه استفاده شد. برای این منظور، در ابتدا، مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز توزیع ذرات با



شکل ۷- (الف) تصویر SEM حاصل از نانو سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرنانانت کشتی *P. pseudoalcaligenes* Cd11 و (ب) هیستوگرام مربوط به دامنه پراکنش اندازه نانو سولفید کادمیوم سنتز شده.

نشانهگر یک عنصر می باشند. آنالیز EDX وجود عناصر Cd و S را در ترکیب نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی را تأیید می کند.

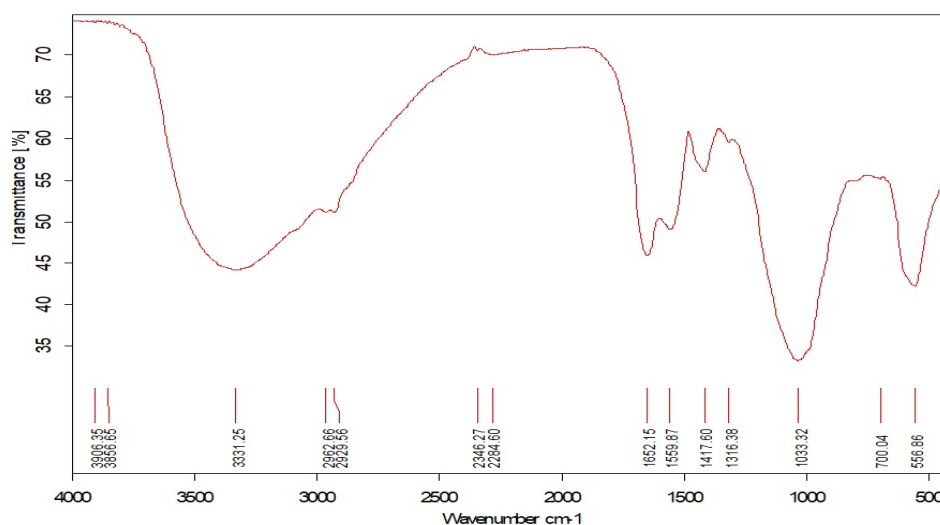
در ادامه و با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری و مشخص نمودن ترکیب عنصری نمونه نانوذره زیستی سنتز شده، از طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد. در شکل (۸) هریک از پیکهای نشان داده شده مختص یک اتم و



شکل ۸- طیف EDX از نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشتی *P. pseudoalcaligenes* Cd11

پروتئین پوشش دهنده باکتری باشد. دو پیک ظاهر شده در محدوده ۲۹۲۹ تا ۲۹۶۲ مربوط به گروه C-H کششی موجود در ترکیبات آلی می‌باشد. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۶۵۲ مربوط به C=O کششی در ترکیبات آلی است. پیک ظاهر شده در عدد موجی ۱۰۳۳ مربوط به پیوند C-N موجود در پروتئینها می‌باشد و در نهایت پیک ظاهر شده در عدد موجی ۵۵۶/۸۶ مربوط به تشکیل پیوند فلزی می‌باشد که این می‌تواند نشان بدهد پیوند Cd-S در این محدوده تشکیل گردیده و نشان از سنتز نانوذرات زیستی سولفید کادمیوم توسط باکتری است (شکل ۹).

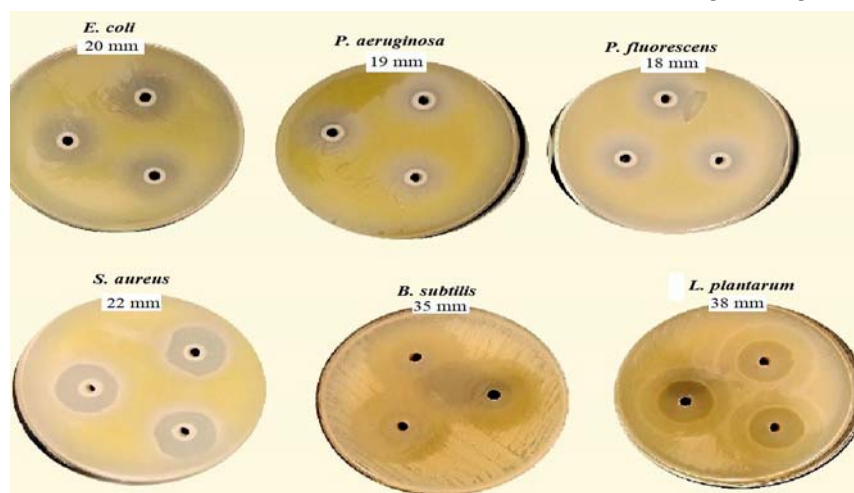
در نهایت و با هدف بررسی وجود احتمالی عوامل پوشاننده (Capping Agents) زیستی در نانوذرات سنتز شده، آنالیز FTIR انجام شد (شکل ۹). با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز FTIR می‌توان گفت که پیک پهن ظاهر شده در محدوده عدد موجی ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ مربوط به گروه OH موجود در حلال آب و یا گروه کریوکسیلیک اسید می‌باشد. از طرفی چون پیک مربوطه پهن می‌باشد می‌توان گفت که گروه OH پیوند هیدروژنی برقرار نموده است. این پیوند می‌تواند مربوط به خود حلال آب یا مربوط به پیوند OH با ترکیبات آمینی موجود در ساختار



شکل ۹- طیف FTIR از نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده توسط سوپرناتانت کشتی *P. pseudoalcaligenes* Cd11

باکتری *L. plantarum* با مهار ۳۸ میلی‌متر از خود نشان داد و کمترین میزان مهارکنندگی را با مهار ۱۸ میلی‌متری بر علیه باکتری *P. fluorescens* نشان داد. اثر مهاری بر سایر باکتریهای مورد مطالعه نیز با میانگین مهاری ۱۹ تا ۳۵ میلی‌متری نشان داده شد (شکل ۱۰).

نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده توسط سوپرانانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 به روش انتشار از چاهک بر آگار: نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی نشان‌دهنده اثر مهاری نانوذرات سولفید کادمیوم تولید شده می‌باشد. طی این روش، بیشترین اثر مهاری نانوذره بر علیه



شکل ۱۰- اثر مهاری نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی بر علیه برخی گونه های باکتری.

به آنها متصل شوند. از کار بردهای این نانو ذرات می‌توان به: تحویل فعال دارو، آزمایشهای تشخیص زیستی و تصویر برداری اشاره کرد (۱۷ و ۲۹). در این پژوهش، جداسازی و تعیین هویت سویه‌های باکتری آبی با توانمندی سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم مورد مطالعه قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های دریازی شامل باکتری، مخمر، قارچ، سیانوباکتر و اکتینوباکتر می‌باشد که در اقیانوسها زندگی می‌کنند و ۹۸ درصد از زیست توده اقیانوسها را تشکیل می‌دهند. این میکروارگانیسم‌ها در دریا که محیطی پر تنش است در طیف وسیعی از شرایط اسیدی، قلیایی، حرارت بالا، مواد مغذی کم، محتوای فلزی بالا و شوری بیش از حد حضور دارند. شرایط در دریاها پویاست و میکروارگانیسم‌هایی که در آن حضور دارند دارای مکانیسمهای منحصر به فرد برای انطباق سریع با این تغییرات هستند (۵). عواملی مانند انتشار فاضلابهای صنعتی، حمل و نقلهای دریایی، آتشفشانها، فرسایش سنگها

بحث

با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روشهای فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات فلزی وجود دارد، استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف به‌عنوان نانوکارخانه‌های بالقوه سبز برای سنتز نانوذرات فلزی همسو و سازگار با محیط زیست، پایدار و همچنین مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی پیشنهاد شده است. نانوذرات فلزی شامل نانوذرات عنصری، نانوآکسیدهای فلزی و سولفیدهای فلزی (به ویژه کوانتوم دات سولفید کادمیوم) دارای خواص الکتریکی منحصر به فردی هستند که با توجه به این خواص در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی کاربرد دارند. در حال حاضر این نانو ذرات به عنوان بهترین حامل برای تحویل دارو و بیوسنسور ظاهر شده‌اند. کار کردن روی سطح این نانو ذرات به راحتی انجام می‌پذیرد و می‌توان لیگاندهای مختلف مانند قندها، پپتیدها، پروتئین و DNA

نانومتر با میانگین اندازه ۱۵/۵ نانومتر در pH بهینه برابر ۸ و دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۱۰ ساعت گرماگذاری در دور شیکر ۱۵۰ g بوده است. در این پژوهش همچنین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سولفید کادمیوم تشکیل‌شده توسط سوپرناتانت کشت باکتری *P. pseudoalcaligenes* سویه Cd11، علیه برخی باکتریهای گرم مثبت، گرم منفی بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات زیستی تولیدشده علیه همه میکروبیهای تست‌شده اثر مهارکنندگی رشد را دارد. با این حال، حساسیت باکتریهای گرم مثبت تست شده در مقایسه با باکتریهای گرم منفی تست شده بیشتر بود. سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم در طیف وسیعی از میکروارگانسیم‌ها گزارش شده است. احمد (Ahmad) و همکاران (۲) با استفاده از سوپرناتانت کشت قارچ *Fusarium oxysporum* سنتز نانوذرات سولفید کادمیوم از محلول نمکی سولفات کادمیوم را در محدوده بین ۵ تا ۲۰ نانومتر را گزارش دادند. سانگی (Sanghi) و همکاران (۲۸) با استفاده از سوپرناتانت قارچ *Coriolus versicolor* سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم از محلولهای نمکی نترات کادمیوم و سولفید سدیم (به‌عنوان پیش‌ساز) را در محدوده ذرات بین ۸ تا ۱۵ نانومتر را گزارش کردند. بای (Bai) و همکاران (۴) با استفاده از سوپرناتانت کشت باکتری *Rhodopseudomonas palustris* سنتز نانوذرات سولفید کادمیوم از محلول نمکی سولفات کادمیوم را در محدوده بین ۶ تا ۱۱ نانومتر را گزارش دادند. پرساد (Prasad) و همکاران (۲۵) با استفاده از مخمر *Sachharomyces cerevisiae* موفق به دست‌یابی به نانوذرات خارج سلولی سولفید کادمیوم با پراکنش ذرات بین ۲/۵ تا ۵/۵ نانومتر از محلولهای پیش‌ساز کلرید کادمیوم و سولفید هیدروژن شدند. شانسوری (Shanshoury) و همکاران (۳۰) با استفاده از سویه باکتری استاندارد *Bacillus subtilis* ATCC6633 موفق به سنتز خارج سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم از پیش‌سازهای

و نشست نفت باعث افزایش اثرات مواد تشکیل‌دهنده آلی و غیره آلی در محیط دریا می‌شوند. میکروارگانسیم‌هایی که در چنین محیط‌های خشنی زندگی می‌کنند اغلب انواع مولکولهای زیستی را برای مقابله با آلودگیهای مختلف از جمله گونه‌های فلزی سنتز می‌کنند. اکثر میکروارگانسیم‌ها که در حضور فلزات زندگی می‌کنند از طریق مکانیسم‌هایی مانند جذب زیستی، رسوب زیستی و ترشح خارج سلولی خود را با شرایط سازگار کرده‌اند. نتیجه این فرآیندها ممکن است منجر به سنتز نانوذرات به شکل داخل سلولی یا خارج سلولی شود. در حال حاضر روشهای میکروبی برای سنتز نانومواد با ترکیبات مختلف بسیار محدود بوده و بیشتر مربوط به سنتز نانو ذرات فلزی و تا حدودی سولفیدهای فلزی و تعداد بسیار کم از اکسید فلزها می‌باشد. مطالعه میکروبیهای دریازی برای بیوسنتز نانو ذرات و کشف مسیرهای بیوشیمیایی که منجر به کاهش یونهای فلزی می‌گردد بسیار حائز اهمیت است (۱۳). براساس یافته‌های به‌دست آمده در این پژوهش، سوپرناتانت *P. pseudoalcaligenes* سویه Cd11 قادر به سنتز زیستی نانوذرات سولفید کادمیوم به‌صورت برون سلولی بود. مزیت تولید برون سلولی نانوذره سولفید کادمیوم توسط سویه باکتری جدا شده در تحقیق حاضر در این است که تولید درون سلولی نانوذره مذکور پرهزینه بوده و نیاز به مراحل اضافی جهت استخراج نانوذرات از درون سلول دارد؛ بنابراین به‌وسیله باکتری مذکور می‌توان به تولید برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم، بدون نیاز به مراحل پیچیده استخراج دست یافت. سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم تولید شده توسط باکتری *P. pseudoalcaligenes* Cd11 تحت شرایط بهینه واکنش زیست‌تبدیلی مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج به‌دست آمده، سوپرناتانت سویه مذکور بعد از مواجهه با محلول سولفات کادمیوم (غلظت بهینه ۳ میلی‌مولار از یون کادمیوم)، قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم کروی در محدوده پراکنش ذرات بین ۱۲ تا ۱۹

منجر به توسعه کاتالیزگرهای میکروبی کارآمد در صنایع فناوری نانو گردد. این پژوهش بر جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری آبی با قابلیت تحمل پذیری بالا به یون سمی کادمیوم و امکان بهره برداری از ترشحات باکتری به- عنوان کاتالیزگر برای سنتز برون سلولی نانوذرات سولفید کادمیوم متمرکز شده است. در این مطالعه برای نخستین بار سنتز برون سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم در دامنه پراکنش محدود و همگن در سویه باکتری آبی *P. pseudoalcaligenese Cd11* گزارش شده است. بنابراین نتایج این پژوهش می‌تواند در راستای معرفی سویه‌های میکروبی جدید به مراکز علمی پژوهشی، مراکز دانشگاهی و نانوزیست فناوری به منظور انجام تحقیقات بیشتر با هدف بهره برداری تجاری از نانوذرات سنتز شده، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده که با حمایت دانشگاه کردستان به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نموده‌اند، کمال قدردانی و سپاسگزاری را دارد.

کلرید کادمیوم و سولفید سدیم با محدوده پراکنش ۲/۵ تا ۵/۵ نانومتر شدند. در مطالعه مشابه صورت گرفته، حسینی (Hosseini) و همکاران (۱۴) با استفاده از سویه باکتری استاندارد *Bacillus licheniformis* MTCC 9555 موفق به سنتز برون سلولی نانوسولفید کادمیوم از پیش سازهای کلرید کادمیوم و سولفید سدیم با محدوده پراکنش ۴/۶ تا ۵/۶ نانومتر شدند. مالارکودی (Malarkodi) و همکاران (۲۰) با استفاده از سویه باکتری *Klebsiella pneumonia* MAA موفق به دست یابی به نانوذرات خارج سلولی سولفید کادمیوم با پراکنش ذرات بین ۱۰ تا ۲۵ نانومتر از محلولهای سولفات کادمیوم شدند. براساس نتایج حاصل از این پژوهش و در مقایسه با پژوهشهای مشابه صورت گرفته می‌توان گفت که نانوذرات سولفید کادمیوم سنتز شده از پیش ساز نمکی ارزان قیمت سولفات کادمیوم در مطالعه اخیر دارای دامنه پراکنش اندازه ذرات مناسب و همگن بوده که همین امر کارآیی نانوذرات زیستی سنتز شده را برای فعالیتهای آزمایشگاهی و پژوهشی مناسب می‌کند.

نتیجه گیری

جداسازی و شناسایی سویه‌های جدید میکروبی با امکان تولید برون سلولی کوانتوم دات سولفید کادمیوم می‌تواند

منابع

- ۱- آشننگرف م. ۱۳۹۳. معرفی سویه جدید مخمری *Candida sp.* strain MY2 با توان بالقوه سنتز سریع و برون سلولی
- ۲- Ahmad, A. Mukherjee, P. Mandal, D. Senapati, S. Khan, M.I. Kumar, R. and Sastry, M. (2002) Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. J Am Chem Soc 124:12108-12109.
- ۳- Ajayan, P.M. Schadler, L.S. and Braun, P.V. (2003) Nanocomposite Science and Technology (Wiley VCH, Weinheim).
- ۴- Bai, H. Zhang, Z. Guo, Y. and Yang, G. (2009) Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. Colloids Surf B 70: 142-146.
- ۵- Baker, S. Harini, B.P. Rakshith, D. and Satish, S. (2013) Marine microbes: invisible nanofactories. J Pharm Res 6: 383-388.
- ۶- Balouiri, M. Sadiki, M. and Ibsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. J Pharm Anal 6 (2): 71-79.
- ۷- Bhatia, S. (2016) Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In: Natural polymer drug delivery systems. Springer, pp 33-93.
- ۸- Cunningham, D.P. and Lundie, L. (1993) Precipitation of cadmium by *Clostridium*

نانوکریستالهای اکسید روی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۲، صفحات ۱۵۵-۱۶۶.

- thermoaceticum*. Appl Environ Microbiol 59: 7-14.
9. Dameron, C. Reese, R. Mehra, R. Kortan, A. Carroll, P. Steigerwald, M. Brus, L. and Winge, D. (1989) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. Nature 338: 596-597.
 - 10- Hulkoti, N.I. and Taranath, T. (2014) Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. Colloids Surf B: Biointerfaces 121: 474-483.
 - 11- Holmes, J.D. Richardson, D.J. Saed, S.R. Evans-Gowing, D.A. and Russell, J.R. (1993) Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*, Microbiology 14: 2521-2530.
 - 12- Holt, J.G. Krieg, N.R. Sneath, P.H.A. Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
 - 13- Haferburg, G. and Kothe, E. (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. J Basic Microbiol 47(6):453-67.
 - 14- Hosseini, M.R. and Sarvi, M.N. (2015) Recent achievements in the microbial synthesis of semiconductor metal sulfide nanoparticles. Mater Sci Semicond Process 40: 293-301.
 - 15- Kowshik, M. Deshmukh, N. Vogel, W. Urban, J. Kulkarni, S.K. and Paknikar, K.M. (2002) Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. Biotechnol Bioeng 78:583-588.
 - 16- Li, X. Xu, H. Chen, Z.S. and Chen, G. (2011) Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. J Nanomater 2011: 270974.
 - 17- Mehdinia, A. Kazemi, S.H. Bathaie, S.Z. Alizadeh, A. Shamsipur, M. and Mousavi, M.F. (2009) Electrochemical DNA nano-biosensor for the study of spermidine-DNA interaction. J Pharm Biomed Anal 49: 587-593.
 - 18- Mo, X. Wang, C. Hao, L. You, M. Zhu, Y. Chen, Z. and Hu, Y. (2001) Convenient microemulsion route to star-shaped cadmium sulphide pattern at room temperature. Mater Res Bull 36(11): 1925-1930.
 - 19- Mubarak, A.D, Gopinath, V. Rameshbabu, N. and Thajuddin, N. (2012) Synthesis and characterization of CdS nanoparticles using C-phycoerythrin from the marine cyanobacteria. Mater Lett 74: 8-11.
 - 20- Malarkodi, C. Rajeshkumar, K. Paulkumar, M. Vanaja, G. and Annadurai. G (2014) Biosynthesis and antimicrobial activity of semiconductor nanoparticles against oral pathogens, Bioinorg Chemistry Appl (2014): 1-10.
 - 21- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C and Helmuth, R. (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Appl Environ Microbiol 69, 290-296.
 - 22- Narayanan, K.B. Sakthivel, N. (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Colloid Interface Sci 156: 1-13.
 - 23- Pawar, V. Shinde, A. Kumar, A.R. Zinjarde, S. and Gosavi, S. (2012) Tropical marine microbe mediated synthesis of cadmium nanostructures Sci AdvMater 4: 135-142.
 - 24- Pena, J. Martinez, A. Conde, F. Gonzalez-Callet, J.M. and Vallet-Regi, M. (1997) In situ growth of SrTiO₃ thin films prepared by AACVD from strontium and titanium oxide bisdipivaloylmethanates, Solid State Ionics 101-103 (1997) 183.
 - 25- Prasad, K. Jha, A.K. (2010) Biosynthesis of CdS nanoparticles: an improved green and rapid procedure. J Colloid Interface Sci 342: 68-72.
 - 26- Raj, V. Dalei, K. Chakraborty, J. and Das, S. (2016) Extracellular polymeric substances of a marine bacterium mediated synthesis of CdS nanoparticles for removal of cadmium from aqueous solution. J Colloid Interface Sci 462: 166-175.
 - 27- Rai, M. Gade, A. Yadav, A. (2011) Biogenic nanoparticles: an introduction to what they are, how they are synthesized and their applications, Metal nanoparticles in microbiology, Springer, pp. 1-10.
 - 28- Sanghi R, Verma, P. (2009) A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus. Chem Eng J 155: 886-891.
 - 29- Slowing, I.I. Vivero-Escoto, J.L. Wu, C.W. and Lin, V.S.Y. (2008) Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. Adv drug deliv rev 60: 1278-1288.

- 30- Shanshoury, A.E.R.R. Elsilik. S.E. Ebeid M.E. (2012) Rapid biosynthesis of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles using culture supernatants of *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079T. *Afr J Biotechnol* 11: 7957-7965.
- 31- Steen, W.M. and Mazumder, J. (2010) *Laser Material Processing* (4th edition). Great Britain. Springer-Verlag. ISBN 978-1-84996-062-5.
- 32- Sweeney, R.Y.C. Mao, X. Gao, J.L. and Burt, A.M. (2004) Belcher, G. Georgiou, B.L. Iverson, Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. *Chem Biol* 11: 1553-1559.
- 33- Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipski, A. Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725–2729
- 34- Weisburg, W.G. Barns, S.M. Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173: 697–703.
- 35- Xie Q., Wang Y., Pan B., Wang H., Su W., Wang X., A novel photocatalyst LaOF: Facile fabrication and photocatalytic hydrogen production, *Catal. Commun* 27 (2012) 21-25.

Rapid Extracellular Synthesis of Cadmium Sulfide Nanoparticles by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Cd11 and Study of its Antibacterial Activity

Ashengroph M. and Khaledi A.

Biological Sciences Dept., Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

Cadmium sulfide nanoparticles (CdS NPs) have many commercial applications in making dye-sensitized solar cells, light emitting diodes (LED) and nanobiosensors due to their unique properties. In this work, screening of aquatic bacterial strains for their ability in the green extracellular synthesis of CdS NPs was studied. The prepared nanoparticles were examined using Optical emission and absorption spectroscopy analyses, Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS) Scanning electron micrograph analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). 32 cadmium-resistant aquatic strains were isolated by using enrichment. Among isolated strains, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* is capable to synthesize CdS NPs. The extracellular nanoparticles produced by the strain Cd11 were investigated under optimal culture conditions. The results showed that culture supernatant of strain Cd11 treated with CdSO₄ (3 mM) was able to catalyze the extracellular synthesis of CdS NPs in the range of 12-19 nm with an average size of 15.5 nm after 10 h of incubation at pH 8.0 and temperature 35 °C. To evaluate the antibacterial activity of nanoparticles, agar well diffusion method was tested. Based on obtained results, CdS nanoparticles had an inhibitory effect against all tested microorganisms. Additionally, particles size distribution of CdS nanoparticles synthesized by culture supernatant of strain Cd11 had a good monodispersity and homogeneity for the specific applications.

Key words: CdS nanoparticles, Extracellular synthesis, Resistance pattern, Antibacterial activity, *P. pseudoalcaligenes* strain Cd11